

En 99-97

## (54) IMMOBILIZED MICROORGANISM AND PRODUCTION THEREOF

(11) 62-158485 (A) (43) 14.7.1987 (19) JP

(21) Appl. No. 61-1825 (22) 7.1.1986

(71) AGENCY OF IND SCIENCE &amp; TECHNOL(1)

(72) YOSHIKO NAKAHARA(1)

(51) Int. Cl. C12N11/14, A21D8/04//A23C19/04, C12J1/00, C12P7/06, C12P7/16, C12P7/28

*Wz*

**PURPOSE:** To produce a highly active immobilized microorganism having high mechanical strength and excellent permeability and compatibility to the liquid to be treated, by including a microorganism in a microcapsule composed of a spherical porous hollow inorganic wall having high chemical and physical stability.

**CONSTITUTION:** Cells of a microorganism other than wine yeast are optionally immobilized with a polymeric compound or an oily substance and dispersed in an aqueous solution containing one or more kinds of inorganic compounds selected from silicate, carbonate, phosphate and sulfate of an alkali metal and halide of alkaline earth metal. An organic solvent having a water solubility of  $\leq 5\%$  is mixed to the dispersion to obtain a W/O-type emulsion. An aqueous solution of a compound capable of forming a water-insoluble precipitate by the reaction with the above inorganic compound in aqueous solution is added to the above emulsion to obtain a microcapsule containing the microorganism and having spherical porous inorganic wall.

## LEGENDE

zu den Bibliographiedaten	(54) Titel der Patentanmeldung	(22) Anmeldetag in Japan
	(11) Nummer der JP-A2 Veröffentlichung	(71) Anmelder
	(21) Aktenzeichen der JP-Anmeldung	(52) Japanische Patentklassifikation
	(43) Veröffentlichungstag	(51) Internationale Patentklassifikation

BEST AVAILABLE COPY

## ⑫ 公開特許公報(A)

昭62-158485

⑤ Int. Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	④ 公開 昭和62年(1987)7月14日
C 12 N 11/14		7823-4B	
A 21 D 8/04		6712-4B	
// A 23 C 19/04		8114-4B	
C 12 J 1/00		6760-4B	
C 12 P 7/06		7236-4B	
7/16		7236-4B	
7/28		7236-4B	
		審査請求 有	発明の数 2 (全6頁)

⑬ 発明の名称 固定化微生物並びにその製造方法

⑭ 特 願 昭61-1825

⑮ 出 願 昭61(1986)1月7日

⑯ 発 明 者 中 原 佳 子 池田市荘園1丁目9番20号  
 ⑯ 発 明 者 水 口 正 昭 大阪市東淀川区豊里5-17-1  
 ⑰ 出 願 人 工 業 技 術 院 長  
 ⑱ 復 代 理 人 弁 理 士 尾 関 弘  
 ⑲ 出 願 人 鈴 木 油 脂 工 業 株 式 有 限 公 司 大阪市淀川区下新庄1丁目8-22  
 ⑳ 代 理 人 弁 理 士 尾 関 弘

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

固定化微生物並びにその製造方法

## 2. 特許請求の範囲

- (1) アルカリ土類金属炭酸塩、アルカリ土類金属リン酸塩、アルカリ土類金属硫酸塩、金属水酸化物、金属珪酸塩及び金属炭酸塩の少なくとも1種を壁物質とし、その内部に微生物を包含して成ることを特徴とする球形多孔質中空無機質壁による固定化微生物。
- (2) 微生物が予め高分子化合物乃至油状物質で固定化されたものである特許請求の範囲第1項に記載の微生物。
- (3) (i) アルカリ金属の珪酸塩、炭酸塩、リン酸塩、並びに硫酸塩、及びアルカリ土類金属のハロゲン化合物から選ばれた無機化合物の少なくとも1種を含む水溶液に、(ii) 微生物を添加して分散せしめ、次いで(iii) 有機溶剤を添加混合してW/O型乳化液とした後、(iv) アルカリ土類金属のハロゲン化合物、無機酸、有機酸、

無機酸のアモニウム塩、有機酸のアモニウム塩及びアルカリ金属の炭酸塩の少なくとも1種であって且つ上記無機化合物との水溶液反応によって水不溶性の沈澱を形成しうる化合物の水溶液を添加混合することを特徴とする固定化微生物の製造方法。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は各種発酵物質の製造やその他微生物を用いる分野に使用される各種微生物を包括固定化する技術に関するもので、化学的、物理的に安定な球形多孔質中空無機質壁のマイクロカプセルに微生物を包括し発酵をはじめ各種の分野に供しうる固定化微生物およびその製造法に係るものである。

(従来の技術)

従来微生物の固定法としては各種文献にも見られるように、包括法と吸着法の2種類があり、包括法に用いる担体としては、カラギーナン、セルロース、寒天、アルギン酸カルシウムの如き多糖

類、コラーゲン、セラチンの如き蛋白質、ポリアクリルアミド、ポリビニールアルコール、光硬化性樹脂の如き合成高分子物質などがある。また一方吸着法に用いる素材としては、多孔質ガラス、シリカ、セラミックス等の無機質物質がある。また親水性ゲルを用いる包括法として多孔質素材を用いる吸着法もあるが、多孔質無機質素材を用いる包括法は現在までのところ知られていない。

而して包括法は上記で述べた通り、原則的には有機質素材を用いて酒酵母等の微生物を包括即ち担体内に微生物を含有せしめる形態をとるのが普通であり、このため担体内に包括された微生物が発酵対象物質中に混入することが極めて少ないという利点を有するが、反面、被処理液と微生物との接触が悪く微生物に依る作用たとえば発酵の進行が遅いという難点がある。またこの包括法に於いては有機質素材を用いているために、無機質素材に比し、その機械的強度が弱く、且つ化学的安定性に於いても十分に満足出来るものではない。

一方無機質素材を主に用いる吸着法では担体に

微生物が吸着されているために包括法に比しその接触は大きく、このためその作用並びに効果は非常に良く進行するという利点、並びに無機質素材を用いているために機械的強度が大きく且つ化学的にも安定性が大きいという利点を有する反面、徐効性が殆んど無く、また微生物の保護という点にも問題があった。また被処理液中に微生物が混入しても支障のない分野にのみしか使用出来ないという制限も生じた。

(発明が解決しようとする問題点)

本発明が解決しようとする問題点は、上記従来方法の難点を解消し、利点だけを有する新しい方法を開発せんとすることであり、これを換言すれば包括法の利点と吸着法の利点を有し、且つこれ等両方法の難点のない方法を提供することである。即ち、固定化されたマイクロカプセル内の微生物に対し、処理対象液の透過性並びに接触性が良好で、活性の高いしかも化学的並びに物理的に安定な固定化微生物、並びにその製造方法を提供することである。

(上記問題点を解決するための手段)

上記問題点は、アルカリ土類金属炭酸塩、アルカリ金属リン酸塩、アルカリ土類金属硫酸塩、金属水酸化物、金属珪酸及び金属炭酸塩の少なくとも1種を壁物質とし、その内部に微生物を内包せしめることによって達成される。

(発明の構成)

本発明は基本的には上記無機質の壁材料からなるマイクロカプセルの内部に微生物(但し酒酵母は除く)が内包された構造を有し、更に、該微生物が高分子物質或いは油状物質で予め固定化された構成の場合も包含される。

本発明に於いて、マイクロカプセルの外壁を構成する無機材料(これを壁物質という)としては、以下の如きものが挙げられ、その1種又は2種以上を使用する。

アルカリ土類金属炭酸塩……炭酸カルシウム、炭酸バリウム、炭酸マグネシウム等。

アルカリ土類金属リン酸塩……リン酸カルシウム、リン酸バリウム、リン酸マグネシウム等。

アルカリ土類金属硫酸塩……硫酸カルシウム、硫酸バリウム、硫酸マグネシウム等。

金属酸化物……シリカ(無水珪酸)

金属水酸化物……水酸化鉄、水酸化ニッケル、水酸化アルミニウム、水酸化カルシウム、水酸化クロム等。

アルカリ土類金属以外の珪酸塩……珪酸亜鉛、珪酸アルミニウム、珪酸銅、珪酸アルミニウムマグネシウム等。

アルカリ土類金属以外の炭酸塩……炭酸亜鉛、炭酸アルミニウム、炭酸コバルト、塩基性炭酸銅、炭酸ニッケル等。

本発明に於いて、マイクロカプセルの中空部に内包される微生物としては清酒の製造に使用されて来た酵母以外の各種微生物が広い範囲で使用される。

酒類以外の各種発酵たとえば酒類以外の各種アルコール発酵、食酢、醤油、廃液処理(活性汚泥)、みそ、納豆、パン類、乳酸菌飲料、リグニンの分解、乳製品の各種発酵、アセトン・ブタノール

発酵等各種の微生物の作用に基づいて従来から使用されて来た各種の微生物がいずれも広い範囲で包含される。即ち従来知られている微生物はすべて本発明の微生物の範疇に属するものであり、カビ類、酵母類、細菌、バクテリオファージ、キノコ類、藻類等を具体例として例示出来る。

但し本発明に於ける微生物とは微生物自体は勿論のこと、この微生物から生ずる菌体あるいは微生物や菌体から生ずる酵素をも含むものである。

また場合によっては、本発明に於いて使用する微生物としては、予め高分子物質乃至油状物質（以下単に高分子物質という）で固定化された微生物を使用することが好ましい。

本発明に於いては、微生物は被処理物を何等かの作用で分解乃至変質、発酵等を行う作用を有しなければならない、このため微生物自体活性を有する状態で所謂生きた状態でカプセル内に内包されていることが必要である。一方本発明のマイクロカプセル化された微生物を製造するに際しては後記で説明する通りマイクロカプセルを予め製造し

てからこの中に微生物を導入するのではなく、微生物の周囲にマイクロカプセルの外壁を形成して微生物を内包せしめる手段を採用するため、微生物は外壁形成工程に於いて、若干化学的な影響を受けてその活性が減じる場合がある。このような状態に於いては微生物を予め高分子物質で固定化して保護することにより上記外壁形成工程に於ける望ましくない化学的影響を未然に防止することが出来、極めて望ましい手段となる。

而して高分子物質で固定化された微生物自体は従来から知られたものであり、本発明に於いてはこれ等従来から知られた固定化微生物がいずれも有効に使用され、特に好ましいものとして各種多糖類、寒天、アルギン酸塩、 $\gamma$ -カラギーナン、ゼラチン、コラーゲン、ポリアクリルアミド、各種光硬化性樹脂、ポリエチレングリコールの（メタ）アクリレート等で固定化された微生物を例示出来る。また油状物質としては各種の油が使用され、好ましいものとして、サラダ油、てんぷら油等で固定化または被覆された微生物を例示出来る。

本発明のマイクロカプセル化微生物の製造方法としては微生物が活性を有している状態でマイクロカプセル化されるかぎり、特にその製法は限定されるものではないが、たとえば下記の如き方法により製造される。

アルカリ金属の珪酸塩、炭酸塩、リン酸塩及び硫酸塩並びにアルカリ土類金属のハロゲン化物から選ばれた無機化合物の少なくとも1種を含む濃度  $0.3 \text{ mol/l}$  ～飽和の水溶液に、微生物を添加して分散させる。次いで水に対する溶解度が好ましくは5%以下の有機溶媒を混合してW/O型乳濁液とした後、アルカリ土類金属のハロゲン化物、無機酸、有機酸、無機酸のアンモニウム塩、有機酸のアンモニウム塩及びアルカリ金属の炭酸塩の少なくとも1種であって且つ上記無機化合物との水溶液反応によって水不溶性の沈澱（即ち壁物質）を形成し得る化合物の水溶液（濃度  $0.05 \text{ mol/l}$  ～飽和濃度、好ましくは  $0.1 \sim 2 \text{ mol/l}$ ）を、上記W/O型乳濁液と前者100重量部に対し後者等量の割合で混合する。かくして、微生物を内

包する球状の多孔質無機質壁マイクロカプセルが得られる。水に対する溶解度が5%以下の有機溶媒としては、ヘキサン、デカン、ヘキサデカン、イソヘキサン、イソヘプタン等の脂肪族飽和炭化水素；ヘキセン、オクテン、ジメチルブタジエン、ヘプタン等の脂肪族不飽和炭化水素；ベンゼン、トルエン、ドデシルベンゼン、シメン、スチレン等の芳香族炭化水素；シクロヘキサン、シクロヘキセン、シクロノナン等の脂環式炭化水素等が例示され、これ等は単独で又は2種以上併用して使用される。また、これ等有機溶媒には、通常約10重量%までのアルコール類等が混在していても何等差支えない。有機溶媒の使用量は、得られる乳濁液がW/O型となる限り特に限定されないが、通常乳濁液の50重量%以上、好ましくは70～80重量%とするのが良い。乳濁方法は、懸浮方法、乳化法等の常法によれば良い。乳化に際しては、公知の乳化剤を添加することが出来る。乳化剤としては、好ましくはHLBが3.5～6.0の範囲にある非イオン性界面活性剤が使用出来、

ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ソルビタンモノステアレート、ソルビタントリオレート等が代表的なものとして例示される。これ等乳化剤は、有機溶媒に対し通常5重量%以下、好ましくは0.01～3重量%程度使用するのが良い。この様な製造方法は、特公昭54-6251号公報に開示された手順に順じて、実施することが出来る。

本発明に於いては、上記製造方法で、特に好ましくは固定化された微生物を使用することにより、所期のマイクロカプセル化微生物を得ることが出来るが、更に好ましくは上記製造方法に於いてマイクロカプセル外壁形成工程に於ける望ましくない化学的影響を出来るだけ減じるために、外壁を速やかに形成するような化合物を選択的に組合せて使用することである。このような目的に合致するものとしては、珪酸ソーダの如き珪酸塩と重炭酸アンモニウムの如き重炭酸塩との組合せによるシリカ、炭酸カリウムの如き炭酸塩と塩化カルシ

ウムとの組合せによる炭酸カルシウム、リン酸水素ナトリウムの如きリン酸塩と塩化カルシウムとの組合せによるリン酸カルシウム、硫酸ナトリウムの如き硫酸塩と塩化バリウムとの組合せによる硫酸バリウム等がある。

本発明のマイクロカプセル化微生物に於けるその粒子径は通常5 $\mu$ m以上であり、大きければ大きいほど望ましいが、実際的には5～2000 $\mu$ m程度である。

本発明のマイクロカプセル化微生物は各種の広い分野、即ち酒類以外の従来微生物を使用して来た全ての分野に使用出来る。具体的に説明すると、たとえば微生物が被処理物質中に残存しない各種用途や、微生物自体が被処理物質中に残存していても良い各種用途を例示出来る。更に具体的には前者用途としては各種乳酸飲料の製造、アセトン・ブタノール発酵、リグニンの分解、食酢の製造、ショウ油の製造、廃液処理に使用する活性汚泥等を例示出来る。また後者用途としてはみそ、納豆各種パンや菓子類、各種乳製品の製造、乳酸飲料

の製造等を具体例としてあげることが出来る。

#### (発明の効果)

本発明のマイクロカプセル化微生物を使用すると次の様な優れた効果が期待出来る。

#### (イ) 微生物が残存しない用途に使用する場合

本発明の微生物は無機質多孔質性中空状の微粒子の内部に内包されており、使用中に於いても微生物が外部に殆んど漏出することがない。にもかかわらず多孔質のためにこの間を通して処理対象液の流通がスムーズに行われ、十分に処理対象液と微生物との接触が確保され、有効に微生物の作用が進行する。また使用中に於ける微生物の管理もかなり容易に出来、加えて壁物質が化学的、物理的に安定な無機質成分から成っているために、極めて安定に使用することが出来る。また従来の如きバッチ処理と異なり、連続的に長期間の製造に使用出来るので設備の利用率も良く、すでに報告されている固定化菌体による連続処理に比し優るとも劣ることはない。

#### (ロ) 微生物が残存しても良い用途に使用する場合

すでに述べた通りマイクロカプセル化されているために、直接被処理対象物に接触しないので徐効性があり、たとえばみそやしょう油に使用すると徐々に安定して発酵が継続して生じる利点がある。また微生物自体保護されておりその有効生存期間が著しく延長される。しかもこれ等マイクロカプセル自体、無機質であって特に強い食酢や臭気、味等を有せず、むしろ一種の塩味を賦与するのでこれ等食物の製造に使用しても実質的に食感、味覚等には悪影響は及ばさない。

#### (実施例)

以下に実施例を示して本発明を具体的に説明する。

#### 実施例1

三号珪酸ソーダ6.5モル/l、90mlに、酢酸菌20gを加え1分間攪拌して分散させソルビタンモノラウレート (Span-20) 30g/lの

濃度のシクロヘキサン溶液170ml中に入れて乳化液により7000r.p.m.にて1分間乳化させた。

これを予め作っておいた重炭酸アンモニウム1.5モル/l、500ml中に入れ、ゆるやかに20分間攪拌する。

これを遠心沈降機を用いて固液分離を行う。

酢酸菌カプセル化シリカ、溶剤反応副生成物(炭酸ナトリウム)及び未反応重炭酸アンモニウムの水溶液層に分離する。

このようにして得られた酢酸菌内包シリカは5%スラリーでpHが高くアルカリ性なのでこれを中和するために純水の中に該酢酸菌内包シリカを入れ0.1モル/lのリンゴ酸にてpH5~6に調整する。

これを再び遠心沈降機により酢酸菌内包シリカを回収する。

#### 実施例2

上記実施例1に於いて酢酸菌に代えて乳酸菌(*L.bulgaricus* 種の純培養物)を使用し、その

実施例1と同様に処理してカプセル化された白色朽木材腐朽菌を得た。

#### 参考例1

実施例1のカプセル化酢酸菌を用いてフリングス法に依り食酢を作成した。即ち内側に充填材を支える穴のあいた棚が設けられている円筒状の木製の容器を使用し、この容器内の充填材に上記酢酸菌を含む種酢をしみこませ、ポンプで10~23%のアルコール含有液をくみあげて上から徐々に噴霧する。この際の温度は25~30℃に保つ。アルコール含有液は下方にさがってゆく間に酸化されて酢となって下方から取り出される。下方に集められた酢は経過して清澄後60℃で30分間殺菌した。但し充填材としてはブナ材の腐屑を使用した。

#### 参考例2

実施例2の乳酸菌を用いて酸乳飲料を調製した。

脱脂乳を原料とし、これを95~100℃で45~60分殺菌し、40℃に急冷後実施例2で得たカプセル化乳酸菌をスターターとして乳量に

対しては実施例1と同様に処理してカプセル化された乳酸菌スターターを調製した。

#### 実施例3

上記実施例2に於いて乳酸菌(*L.bulgaricus* 種の純培養物)に代えて乳酸菌(*L.bulgaricus* と *Sc. lactis*の純培養物の1:4(重量比)混合物)を使用し、その他は実施例2と同様に処理した。

#### 実施例4

上記実施例1に於いて酢酸菌に代えてイースト菌を使用し、その他はすべて実施例1と同様に処理してカプセル化イースト菌を得た。

#### 実施例5

上記実施例1に於いて酢酸菌に代えて純培養したブタノール菌を使用し、その他は実施例1と同様に処理してカプセル化されたブタノール菌を得た。

#### 実施例6

上記実施例1に於いて酢酸菌に代えて木材腐朽菌のなかの白色朽木材腐朽菌を使用し、その他は

対して乳酸菌が2~2.5%となるように加え、37~40℃で20~24時間乳酸発酵させる。

乳酸は0.8~1.0%生成され脱脂乳は固化してカード(cud)となる。このカードを粗砕し、これに等量の砂糖を加えて溶解しホモゲナイザーにかけて均質化する。

次に85℃で15分間殺菌を行い、50℃に急冷し香料を乳量に対して0.5%ぐらい加え十分に攪拌してびん詰めにする。

この製品を普通5~6倍に希めて飲用に供する。

#### 参考例3

実施例3で製造したカプセル化乳酸菌を用いてヨーグルトを製造した。

脱脂乳を約2/3まで濃縮し、これに8~9%量の砂糖と香料を適量加え十分に攪拌溶解し、90℃、30分間加熱殺菌し、33~35℃に冷却してからスターターとして実施例3のカプセル化乳酸菌を乳酸菌として2~2.5重量%加え、これを予め殺菌しておいた100ml容のヨーグルトびんに分注して33℃に10時間ぐらい保つ。

この間に0.8～1.2%の乳酸が生成して牛乳は凝固する。

#### 参考例4

実施例4のカプセル化イースト菌を用いてパンを製造した。

強力小麦粉……………100重量部  
水……………60～62重量部  
実施例4のイースト菌……………4重量部  
(イースト菌として)

砂糖……………2重量部  
食塩……………1.5～2重量部

上記配合で充分に攪拌混合し、たたきつけるようにして練りあげる。この際温度を27～29℃に保つ。次いで恒温槽内にて30℃にて2～4時間において充分にイースト菌発酵を行わせてパンを作る。

#### 参考例5

トウモロコシを充分に蒸煮した後60℃で殺菌し、これを培養槽に導入して37℃に冷却する。これに実施例5で得たカプセル化ブタノール菌を

加え充分に発酵させて醗を固型した。この醗を蒸溜塔に移し蒸溜してブタノール、アセトン、エタノールを分離した。

#### 実施例7

実施例1と同じ酢酸菌5gをサラダ油10mℓに加え、これにソルビタンモノラウレート(Span-20)0.3gの存在のもとで激しく分散させた。

これを実施例1と同様に三号珪酸ソーダ6.5モル/ℓ、83mℓ中に加え激しく乳化させO/W型エマルジョンとする。

これを更に30g/ℓの濃度のシクロヘキサン溶液167mℓ中に加えO/W型エマルジョンがこわれないように注意してO/W/O型のエマルジョンを作成する。以後実施例1と同様に処理してマイクロカプセル化酢酸菌を得た。大きさは1000～2000μであった。

(以上)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**